

انتاج السليوليزات من *Aspergillus sp.* المعزول محلياً ودراسة بعض خصائصها واستخداماتها التطبيقية

4- دراسة بعض خصائص أنزيمي السليوليز والسليوبايز
اسوان حمد الله عبود البيار العاني اكرم ثابت الراوي
قسم علوم الأغذية والتقانات الأحيائية / كلية الزراعة / جامعة بغداد

المستخلص

درست بعض الخصائص المهمة لأنزيمي السليوليز والسليوبايز المنتجة من *Aspergillus sp. A18*. ظهر أن الأس الهيدروجيني الأمثل لفعالية أنزيم السليوليز BCI والسليوبايز BCb2 هو 5.0 و 7.0 على الترتيب، في حين تراوح المدى الأمثل لثبات الأنزيمين بين 5.0-7.0، وأظهر BCI ثباتاً حرارياً بين 20-40°م لمدة ساعة في حين كان بين 20-60°م لمدة ساعة للأنزيم BCb2. كانت درجة الحرارة المثلى للسليوليز BCI والسليوبايز BCb2 هي 40°م و 50°م على الترتيب. قدرت قيم K_m و V_{max} للأنزيم BCI باستخدام مادة السليولوز و CMC المعامل والقش المعامل كمواد تفاعل وبلغت قيم K_m 4 ملغم باستخدام السليولوز و 0.8 ملغم باستخدام CMC المعامل و 0.33 ملغم باستخدام القش المعامل أما قيم V_{max} فقد بلغت 41.66 و 20 و 10 مايكرومول/ ساعة على الترتيب. أما بالنسبة للأنزيم BCb2 فقد استخدمت مادة السليوبايز و CMC المعامل كمواد تفاعل، وبلغت قيم K_m 7.69 و 0.28 ملغم على الترتيب، بينما كانت قيم V_{max} 57.14 و 16.66 مايكرومول/ ساعة على الترتيب. جرى تقدير نقاوة الأنزيم باستخدام الهجرة الكهربية وظهرت حزمة واحدة لكل من أنزيمي BCI و BCb2 وقدرت نقطة التعادل الكهربائي لهما فكانت 3.6 و 4.2 على الترتيب. فُسر الوزن الجزيئي لهما بالترشيح الهلامي (Sephadex G-200) فبلغ 104 و 95 كيلودالتون، على الترتيب. أما عند استخدام تقنية الترحيل الكهربائي بوجود SDS فقد كان الوزن الجزيئي لهما 81.28 و 72.44 كيلودالتون على الترتيب. كان أنزيم السليوليز BCI خالياً من الكربوهيدرات في حين بلغت نسبة الكربوهيدرات الكلية في أنزيم السليوبايز BCb2 13.7%. تم تشخيص الكربوهيدرات الناتجة من تحليل السليولوز والسليوبايز بواسطة أنزيمي BCI و BCb2 باستخدام كروماتوغرافي الورقة (PC) وكروماتوغرافي الطبقة الرقيقة (TLC) وتم التأكد من أن نواتج التحليل كانت هي جلوكوز وسليوبايز.

The Iraqi Journal of Agricultural Sciences

Alani & Alrawi

CELLULASES PRODUCTION FROM LOCAL *ASPERGILLUS SP.* ISOLATE AND ASSESING SOME OF THEIR PROPERTIES AND APPLICATIONS

4- STUDYING SOME PROPERTIES OF CELLULASE AND CELLUBIASE

Aswan H.A. Alani Akram Th. Alrawi

Dept. of Food Science and Biotechnology/ College of Agriculture/ Univ. of Baghdad

Abstract

Certain properties of two enzymes cellulase and cellubiase which produced by *Aspergillus sp. A18* were investigated. The optimum pH were 5.0 and 7.0, respectively, pH stability were between 5.0-7.0 for both. The enzyme (BCI) retained 100% of its original activity after incubation at 40°C for 60 min., while 30% of the original activity was lost at 50°C for 60 min. The enzyme (BCb2) retained 100% of its original activity after incubation at 60°C for 60 min. The optimum temp. for (BCI) was 40°C while it was 50°C for (BCb2).

The values of K_m for BCI were estimated by using three kinds of substrates, cellulose, treated CMC and treated wheat straw, were 4, 0.8 and 0.33 mg respectively. V_{max} values were 41.66, 20 and 10 μ mole/hr., respectively. For BCb2, K_m and V_{max} values were estimated by using two substrates which were cellobiose and treated CMC. K_m values were 7.69 and 0.28 mg, respectively, while V_{max} values were 57.14 and 16.66 μ mole/hr., respectively. Isoelectric point for BCI was found to be at pH 3.6 and for BCb2 at pH 4.2. Molecular weight determinations for BCI and BCb2 by gel filtration were 104 and 95 KD respectively, while they were 81.28 and 72.44 KD, respectively as determined by SDS- electrophoresis. It was found that BCI without any carbohydrate while BCb2 consisted of 13.7% carbohydrates. The main final reaction products as analyzed by (PC) and (TLC) were shown to be glucose and cellobiose.

* تاريخ استلام البحث 2006/7/8، تاريخ قبول البحث 2007/4/16
البحث مسئول من أطروحة دكتوراه للباحث الأول.

(*) part pf Ph.D. dissertation for thr first author

المقدمة

exo-β-1,3-Laminari triose و tetraose إنشاج

Glucanase من Basidiomycete spp.

المواد وطرائق العمل:

1- الأس الهيدروجيني الأمثل للفعالية :

تم قياس فعالية أنزيم السليوليز والسلوبايز عند قيم مختلفة من الأس الهيدروجيني هي 2 و 3 و 4 و 5 و 6 و 7 و 8 و 9 و 10 باستخدام محلول منظم يحتوي على كلوريد البوتاسيوم وحامض الهيدروكلوريك، السنترات والفوسفات، والتريس Tris (hydroxymethyl) aminomethane Buffer ، ومحلول منظم الكاربونات-البكاريونات بتركيز 0.2 مولاري . مزج كل من هذه المحاليل مع محلول مادة التفاعل (السليولوز) و (السلوبايز) وقدرت الفعالية الأنزيمية بقياس السكريات المختزلة باستعمال كاشف DNS ، اما البروتين فقد قدر وفقاً لطريقة Lawry المحورة . تعرف وحدة الفعالية الأنزيمية بأنها كمية الأنزيم اللازمة لتحرير 1 مايكرومول من السكريات المختزلة في الساعة الواحدة تحت ظروف التجربة .

2- الأس الهيدروجيني الأمثل للثبات :

حضن كل من أنزيم السليوليز والسلوبايز مع المحاليل المنظمة ذات القيم التالية من الأس الهيدروجيني 2 و 3 و 4 و 5 و 6 و 7 و 8 و 9 و 10 والمحضرة كما في (1) لمدة نصف ساعة في أنابيب اختبار ووضعت هذه الأنابيب في حمام مائي بدرجة 35°م ثم بردت مباشرة في حمام ثلجي جرى بعدها تقدير الفعالية المتبقية لكل أنزيم .

3- الحرارة المثلى للفعالية وطاقة التنشيط :

تم تحديد الحرارة المثلى للفعالية وطاقة التنشيط لتحويل مادة التفاعل الى نواتج بقياس ثابت السرعة الملاحظ على مدى من درجات الحرارة 30 و 35 و 40 و 45 و 50 و 55 و 60°م وحسبت E_a لكل أنزيم باستعمال معادلة أرينيوس $K=Ae^{-E_a/RT}$.

4- الثبات الحراري :

حضن كل من أنزيم السليوليز والسلوبايز بدرجات حرارية مختلفة (20 ، 30 ، 40 ، 50 ، 60 ، 70°م عند

يؤثر الأس الهيدروجيني تأثيراً كبيراً في فعالية الأنزيم ونتيجة لذلك تتأثر سرعة التفاعلات الأنزيمية، ان نشاط الأنزيم عادة يتحدد بمدى معين من قيم الأس الهيدروجيني يطلق عليه الأس الهيدروجيني الأمثل للفعالية والذي يتأثر بعدة عوامل مثل درجة الحرارة وتركيز مادة التفاعل والقوة الأيونية للوسط ووقت التفاعل وتركيز المحلول المنظم (34) .

أما الأس الهيدروجيني الأمثل للثبات فيعتمد على درجة الحرارة والقوة الأيونية ومواد التفاعل وتركيز الأنزيم وطبيعة المحلول الدارئ وتركيز كل من المنشطات والمثبطات (27). تختلف قيم الأس الهيدروجيني الأمثل للفعالية والثبات لأنزيمات السليوليز المنقاة باختلاف مصادرها ونوعياتها.

تعرف درجة الحرارة المثلى للأنزيمات بأنها الدرجة القصوى التي يبدي فيها الأنزيم فعالية ثابتة خلال مدة زمنية تكون في أقل تقدير بطول المدة الزمنية المحددة لقياس الفعالية ، إذ ان معظم التفاعلات الكيميائية تسير بسرعة أكبر عند رفع درجة الحرارة وان الزيادة في درجة الحرارة تمنح الجزيئات المتفاعلة طاقة حركية عالية تتيح لها فرصة التصادم والالتقاء .

أما حرارة الثبات فتعرف بأنها درجة الحرارة التي يبقى فيها الأنزيم محتفظاً بكامل فعاليته في مدة زمنية تكون بطول مدة قياس الفعالية أو أكثر ويتأثر الثبات الحراري للأنزيمات بعدة عوامل لا سيما الأس الهيدروجيني والقوة الأيونية وطبيعة المحلول المنظم ، ووجود أو غياب مواد التفاعل والمنشطات والمثبطات ومدة الحضان وتركيز الأنزيم (27 ، 34) . تختلف درجات الحرارة المثلى للفعالية وثبات الأنزيمات بصورة عامة ومنها السليوليزات المنقاة وعلى اختلاف مصادرها .

تعد الثوابت الحركية معياراً مهماً للتحري عن ألفة الأنزيم تجاه مواد التفاعل المختلفة أي أنها تكشف عن الملاءمة النسبية لمواد التفاعل لأنزيم معين . قام عدد من الباحثين بتقدير قيم الثوابت الحركية للسليوليزات فمثلاً استعمل Tsujisaka وآخرون (30) كلاً من مواد التفاعل الآتية : Laminari و Laminari pentaose و Laminari

- تم حساب قيم V_{max} و K_m لأنزيم السلوبيز وفقاً لمعادلة Lineweaver-Burk (27) .
- 6- تقدير نقاوة الأنزيم بطريقة الترحيل الكهربائي :
اتبعت الطريقة المستخدمة من قبل Garfin (10) لتقدير نقاوة الأنزيم .
- 7- تقدير الوزن الجزيئي :
قدر الوزن الجزيئي لأنزيمي السلوبيز (BCI) و السلوبيز (BCb2) بطريقتين هما الترشيع الهلامي والترحيل الكهربائي .
- 8- تعيين نقطة التعادل الكهربائي (Isoelectric point) :
استخدمت طريقة التثيثر الكهربائي الهلامي (Gel Electrofocusing) المتبعة من قبل Wrigley (36) لتعيين نقطة التعادل الكهربائي لأنزيمي السلوبيز (BCI) و السلوبيز (BCb2) والاستدلال على النقوة .
- 9- تعيين نسبة الكاربوهيدرات :
تم تعيين نسبة الكاربوهيدرات في محلول أنزيمي السلوبيز (BCI) و السلوبيز (BCb2) بطريقة الفينول-حامض الكبريتيك والموصوفة من قبل Dubois وآخرون (9) .
- 10- تشخيص الكاربوهيدرات الناتجة من فعل السلوبيزات :
شخصت الكاربوهيدرات الناتجة من فعل كل من أنزيم السلوبيز (BCI) وأنزيم السلوبيز (BCb2) والتعرف على أنواع السكريات الناتجة وذلك باستخدام تقنية كروماتوغرافيا الورقة Paper Chromatography (PC) و تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة Thin Layer Chromatography (TLC) .
- النتائج والمناقشة**
يلاحظ من شكل 1 الذي يمثل منحنى الأس الهيدروجيني الأمثل لفعالية أنزيم السلوبيز BCI، أن الأس الهيدروجيني الأمثل لفعالية الأنزيم كان 5.0 ويلاحظ الانخفاض التدريجي للفعالية على جانبي الأس الأمثل . لقد وجد Witkowska (35) أن الأس الهيدروجيني الأمثل لفعالية أنزيم السلوبيز المنتج من العفن *Trichoderma viride* هو 5.0 وسبقه Okada (23) في إنتاج أنزيمي السلوبيز من العفن نفسه وكان الأس الهيدروجيني لكلا
- الأس الهيدروجيني الأمثل لثبات ذلك الأنزيم ولمدة ساعة واحدة بعدها نقلت الأنابيب مباشرة إلى حمام ثلجي ثم قيسَت الفعالية المتبقية لكل أنزيم .
- 5- ثابت ميكاليس والسرعة القصوى :
قدرت السرعة القصوى وثابت ميكاليس لأنزيمي السلوبيز (BCI) و السلوبيز (BCb) النقيين باستخدام مواد تفاعل مختلفة وبتراكيز مختلفة ، فقد اختبرت مواد التفاعل السلبيوز و CMC والقش المعامل بالبيريوكسيد القاعدي لأنزيم السلوبيز في حين اختبرت مواد التفاعل السلوبيوز و CMC لأنزيم السلوبيز .
- 1-5- استخدام السلوبيز كمادة تفاعل :
لغرض تحديد ثابت ميكاليس والسرعة القصوى حضر السلوبيز مادة للتفاعل بالتراكيز 2500 و 5000 و 7500 و 10000 و 12000 و 15000 مايكروغرام/مل وتم حساب قيم V_{max} و K_m وفقاً لمعادلة Lineweaver-Burk (27) .
- 2-5- استخدام Carboxy Methyl Cellulose (CMC) كمادة تفاعل :
استخدم CMC كمادة تفاعل لأنزيمي السلوبيز و السلوبيز وذلك بتحضير ما يسمى بالسكريات المتعددة السلوبيزية غير الذائبة Insoluble cellooligosaccharide وذلك حسب طريقة Sakamoto وجماعته (26) . حضرت محاليل بتركيزات 312.5 و 156.25 و 78.125 و 39 و 625 و 1250 مايكروغرام/مل . تم حساب قيم V_{max} و K_m وفقاً لمعادلة Lineweaver-Burk لكل أنزيم .
- 3-5- استخدام القش المعامل كمواد تفاعل :
استخدم قش الحنطة المعامل بالبيريوكسيد القاعدي كمادة تفاعل لأنزيم السلوبيز حيث حضر بتركيزات 2500 و 5000 و 7500 و 10000 و 12000 و 15000 مايكروغرام/مل . تم حساب قيم V_{max} و K_m وفقاً لمعادلة Lineweaver-Burk (27) .
- 4-5- استخدام السلوبيوز كمادة تفاعل :
لغرض تحديد ثابت ميكاليس والسرعة القصوى حضر السلوبيوز كمادة تفاعل بالتراكيز 2500 و 5000 و 7500 و 10000 و 12000 و 15000 مايكروغرام/مل .

الأس الهيدروجيني تراوح ما بين 4.3-6.8 درجة حرارة 50°م للأنزيم الأول ، وما بين 4.6-7.0 درجة 40°م للأنزيم الثاني .

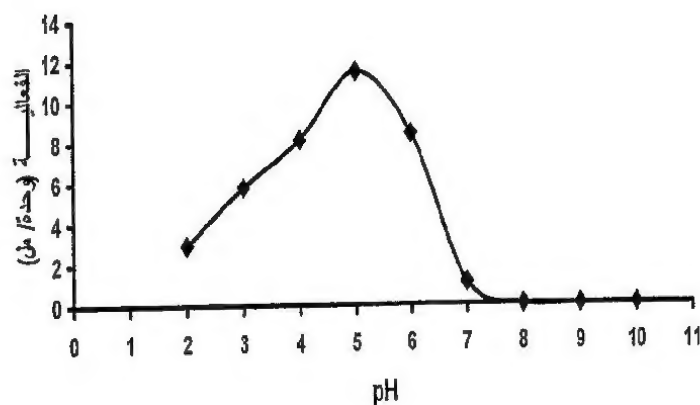
يلاحظ من شكل 1 ان فعالية الانزيم عند القيمة المتعادلة 7.0 تكون منخفضة جداً وان الانزيم يعمل ضمن المدى الحامضي ، وهذا يعني احتمال وجود مجاميع الكاربوكسيل في الموقع الفعال للانزيم .

يمثل شكل 2 منحنى الأس الهيدروجيني الأمثل لفعالية أنزيم السلوبيز (BCb2) إذ يلاحظ ان أعلى فعالية لهذا الأنزيم كانت في الأس الهيدروجيني 7.0 وهذا يتفق مع ما ذكره Cai وآخرون (7) من ان إحدى صورتى الأنزيم β -glucosidase (BGL-I) المنتج من العرمون (Mushroom) الصالح للاستهلاك (*Volvariella* *volacea*) قد أظهر أعلى فعالية له في الأس الهيدروجيني 7.0 ، بينما كان لأس الهيدروجيني الأمثل لفعالية الصورة الأخرى (BGL-II) 6.2 . ذكر Godfrey (11) ان أعلى فعالية للسلوبيز المنتج من *A. niger* تكون في الأس الهيدروجيني 5.0 .

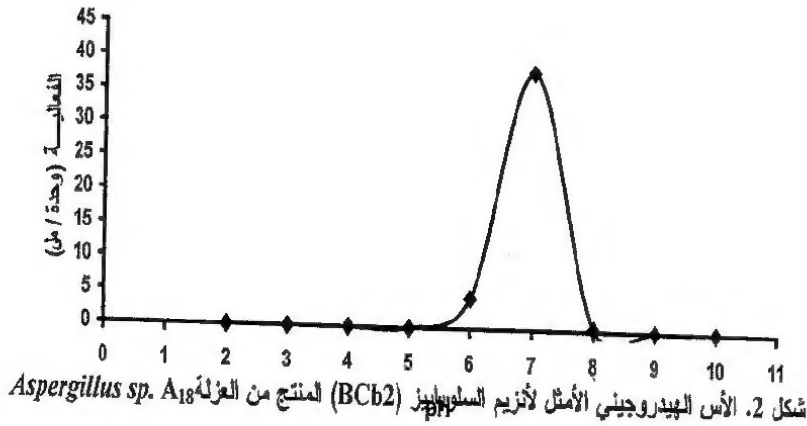
الانزيمين 4.5-5.0 . بينما ذكر Uchino و Nakane (31) ان الأس الهيدروجيني الأمثل لفعالية أنزيم Xylanase الذي مصدره بكتريا *Bacillus spp.* كان 4.0 ، في حين ذكر Tavares وآخرون (28) ان افضل أس هيدروجيني لفعالية أنزيم Xylanase المنتج من قبل *Bacillus spp.* كان 6.0 واحتفظ بمعدل 70% من فعاليته في الأس الهيدروجيني 9.0 .

أما Tsujisaka وآخرون (30) فقد درسوا الأس الهيدروجيني الأمثل لفعالية أنزيم $\text{exo-}\beta$ -1,3-Glucanase إذ كان يساوي 5.8 ، وذكر Uziie وآخرون (32) انهم حصلوا على أعلى فعالية لأنزيم β -xylosidase من الفطر *Chaetomium trilaterale* عند الأس الهيدروجيني 4.2 . يشير Godfrey (11) الى ان أعلى الفعالية لمعظم السلوبيزات الفطرية تكون عند الأس الهيدروجيني 5.0 او ان المعدل يكون ما بين 4-6 ، في حين تكون السلوبيزات المنتجة من الخميرة أعلى فعالية لها عند الأس الهيدروجيني 7.0 ، ولتلك المنتجة من البكتريا تكون أعلى من 7.0 .

أشار باحث آخر (16) الى ان صورتى أنزيم السلوبيز CelA و CelC أظهرتا أعلى فعالية عند مدى من



شكل 1. الأس الهيدروجيني الأمثل لأنزيم السلوبيز (BCI) المنتج من العزلة *Aspergillus sp. A18*



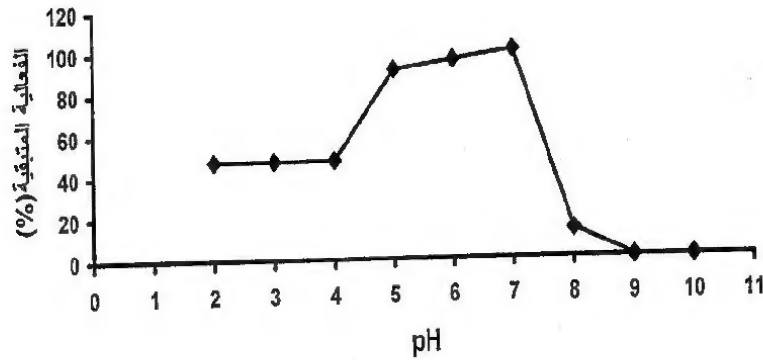
بكتريا *Bacillus spp.* يكون ثابتاً في مدى واسع من الأس الهيدروجيني يتراوح بين 5-10 .
تبدي الأنزيمات بصورة عامة حساسية معينة تجاه التغيرات في درجات الحرارة وذلك من خلال تأثير الحرارة في زيادة أو انخفاض الفعالية الأنزيمية ، ومن هذا المنطلق أجريت تجربة لتحديد تأثير درجة الحرارة في فعالية أنزيمي السلوبيلايز والسلوبيلايز المنقاة قيد الاختبار وضمن مدى حراري تراوح بين 20-70°م . ويلاحظ من الشكل 5 الذي يمثل منحنى درجة الحرارة المثلى لأنزيم السلوبيلايز (BCI) وازدياد الفعالية ما بعد 30°م بشكل حاد وملحوظ وإن أفضل درجة حرارة لعمل هذا الأنزيم كانت عند 40°م حصل بعدها انخفاض تدريجي في الفعالية الأنزيمية حتى 55-60°م ثم اختفت بعدها تماماً . لقد وجد أن أفضل فعالية لأنزيم endoglucanase المنتج من *Trichoderma viride* كانت ما بين 30-40°م بينما كانت أعلى فعالية لأنزيم exoglucanase في درجة 40°م (35). في حين ذكر Okada (23) أن صورتي أنزيم السلوبيلايز المنتج من العفن *T. viride* تظهر أعلى فعالية في 60°م . كذلك بين Sakamoto وآخرون (26) أن الفعالية الأنزيمية لأنزيم Hydrocellulase المنتج من العفن *Aspergillus aculeatus* تكون أعلى ما يمكن في 60°م ، وقد أشير إلى أن أعلى فعالية لأنزيم Xylanase المنتج من البكتريا *Bacillus spp.* تكون في 60°م (28).

إن من بين الصفات المهمة جداً في تحديد ظروف التنقية وخصائص الأنزيم هي الأس الهيدروجيني الأمثل لثبات الأنزيم، ويلاحظ من الشكلين 3 و 4 والتي تمثل منحنى الأس الهيدروجيني الأمثل لثبات أنزيمي السلوبيلايز (BCI) والسلوبيلايز (BCb2) أن المدى الأمثل لثبات الأنزيمين يتراوح ما بين 5.0-7.0 أي أنهما يظهران ثباتاً واضحاً في الأوساط المتعادلة والحامضية القريبة من التعادل ، ويلاحظ انخفاض الفعالية في الأوساط القاعدية فنجد أن أنزيم السلوبيلايز (BCI) يحتفظ بنسبة 50% من فعاليته في (pH=8) في حين انخفضت فعالية أنزيم السلوبيلايز (BCb2) بنسبة 90% . لقد وجد أن السلوبيلازات المنتجة من العفن *T. viride* تكون ثابتة في المدى 5.0-7.0 (23) . كذلك وجد أن أنزيمات endoglucanases المنتجة من العفن *T. viride* تظهر أعلى فعالية في مدى الأس الهيدروجيني المحصور ما بين 4.0-6.0 بينما تكون exoglucanases ثابتة في المدى ما بين 5.0-6.0 (35) .

تختلف السلوبيلازات في مدى ثباتها تجاه الأس الهيدروجيني إذ يلاحظ من الدراسات مألوفة الذكر أن المنيات التي تبدي فيها الأنزيمات ثباتاً واضحاً لا تزيد على وحدتين من الأس الهيدروجيني بينما ذكر Tsujisaka وآخرون (30) أن أنزيم exo-β-1,3-Glucanase المنتج من *Basidiomycete spp.* قد أظهر ثباتاً في مدى كبير من الأس الهيدروجيني 5.1-9.8 . من جهة أخرى ذكر Tavares وآخرون (28) أن أنزيم Xylanase المنتج من



شكل 3. منحنى الأس الهيدروجيني الأمثل لنشاط أنزيم السليوليز (BCI) المنتج من العزلة *Aspergillus sp. A18*



شكل 4. منحنى الأس الهيدروجيني الأمثل لنشاط أنزيم السليوليز (BCb2) المنتج من العزلة *Aspergillus sp. A18*

E_a . تم حساب طاقة التنشيط لتحويل السليولوز الى كلوكوز بفعل أنزيمي السليوليز والسليوبايز من العزلة A_{18} قيد الاختبار ، وفقاً لمعادلة أرينيس إذ تم الحصول على منحنى أرينيس لأنزيم السليوليز (BCI) في الشكل 7 وأنزيم السليوبايز (BCb2) (الشكل 8) والذي يمثل العلاقة بين لوغاريتم ثابت السرعة ($\log K$) ومقلوب درجة الحرارة المطلقة ($1/T$) ، إذ بلغت طاقة التنشيط لأنزيم السليوليز والسليوبايز 11.385 و 8.147 كيلوسعة/مول ، على الترتيب. تقع هذه القيم لطاقة التنشيط ضمن المدى الذي ذكره Whitaker (34) لمعظم الأنزيمات والذي يتراوح ما بين

يوضح الشكل 6 منحنى درجة الحرارة المثلى لأنزيم السليوبايز (BCb2) إذ يمكن ملاحظة الارتفاع التدريجي في الفعالية الأنزيمية في 30°C ولغاية 50°C وهي أعلى قيمة تبلغها الفعالية تلاها انخفاض تدريجي لغاية 70°C تختفي بعدها. أما أنزيم السليوبايز المنتج من عفن *A. niger* ومعظم أنزيمات β -glucosidase الفطرية فانها تبدي أقصى فعالية لها في درجة 60°C (11).

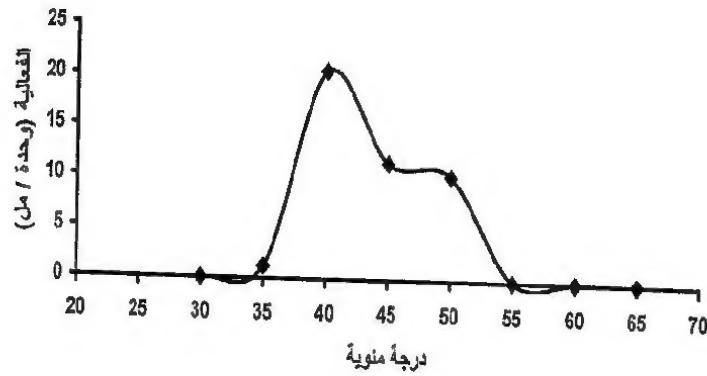
يعبر عادة عن تأثير الحرارة في التفاعلات المحفزة من قبل الأنزيمات بدلالة طاقة التنشيط (Activation energy) وهي أقل طاقة يحتاجها التفاعل لكي يبدأ ويرمز لها

مول. اما بالنسبة لأنزيم Xylanase المنتج من العفن *Aspergillus tamaris* فقد كانت 15.22 كيلوسعة/مول (12).

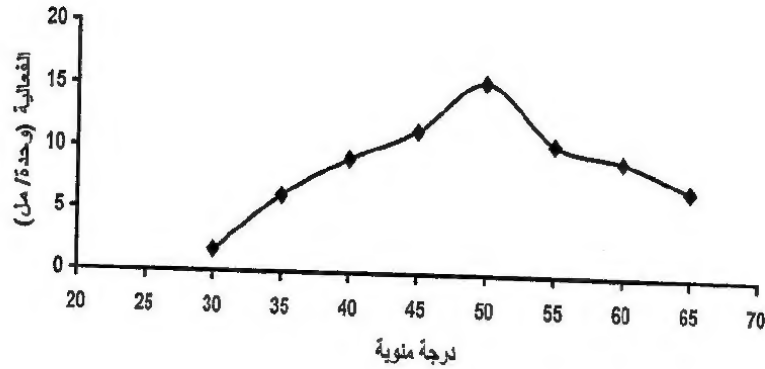
مما تقدم يمكن الاستنتاج ان السلوباييز (BCb2) المنتج من العزلة A₁₈ قيد الاختبار يمكنه العمل في درجة حرارة أعلى من أنزيم السليوليز (BCI)، وبالنتيجة فإنه يحتاج الى طاقة أقل لاستئناف الفعل الحفزي له.

15-6 كيلوسعة/مول. ذكر Miyairi وآخرون (19) ان طاقة التنشيط لأنزيم β -glucosidase كانت 11.1 كيلوسعة/مول.

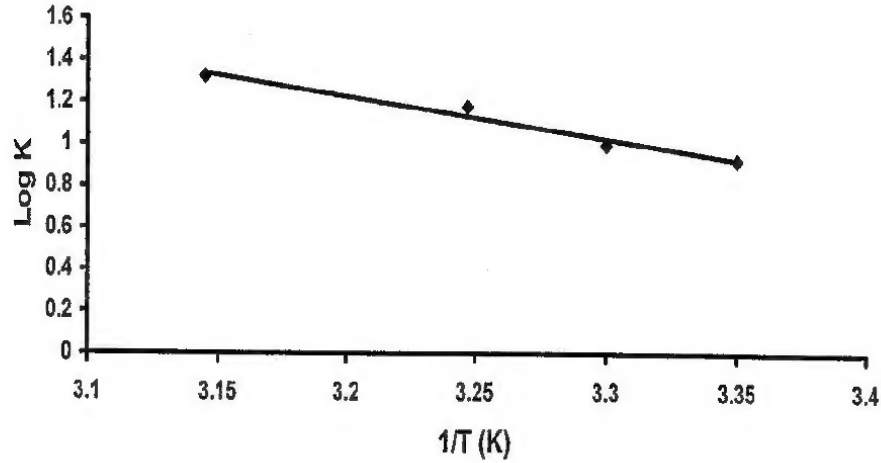
أشار Abdel-Naby (2) الى ان طاقة التنشيط لأنزيم السلوباييز المنتج من العفن *A. niger* كانت حوالي 10.5 كيلوسعة/مول، في حين بين Calsavara وآخرون (8) ان طاقة التنشيط لأنزيم السلوباييز كانت 11 كيلوسعة/



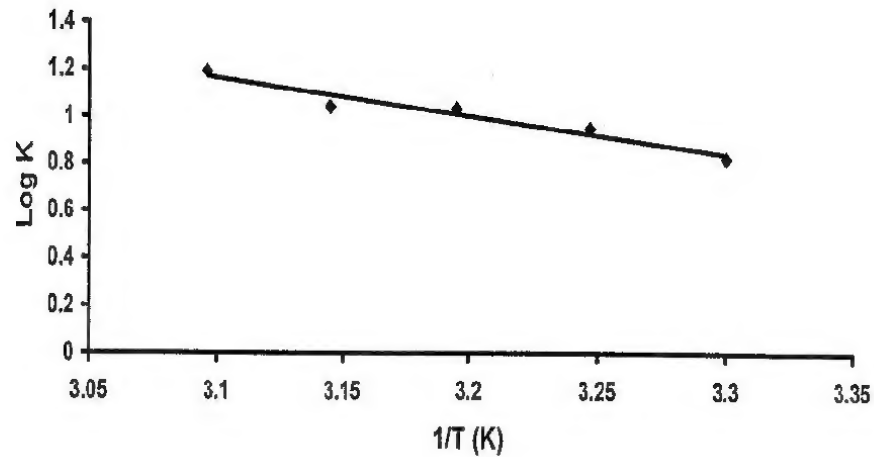
شكل 5. منحنى درجة الحرارة المثلى لأنزيم السليوليز (BCI) المنتج من العزلة A₁₈ *Aspergillus sp.*



شكل 6. منحنى درجة الحرارة المثلى لأنزيم السلوباييز (BCb2) المنتج من العزلة A₁₈ *Aspergillus sp.*



شكل 7. منحنى طاقة التنشيط لأنزيم السليوليز (BCI) المنتج من العزلة *Aspergillus sp. A18*



شكل 8. منحنى طاقة التنشيط لأنزيم السليوليز (BCb2) المنتج من العزلة *Aspergillus sp. A18*

في الأس الهيدروجيني الأمثل لثبات الأنزيم وفي درجات حرارية مختلفة ولوقت محدد.

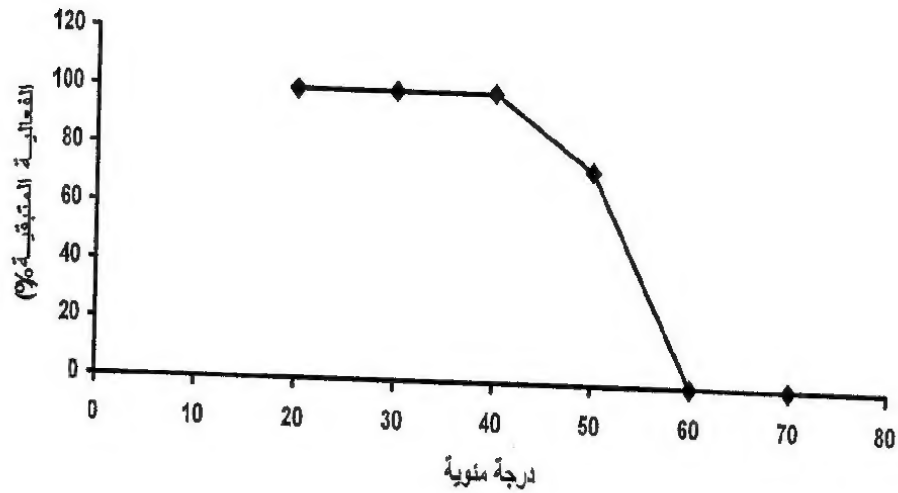
بلا حظ من الشكل 9 الذي يمثل الثبات الحراري لأنزيم السليوليز (BCI)، والشكل (10) الذي يمثل منحنى الثبات الحراري لأنزيم السليوليز (BCb2). ان الأنزيم الأول يظهر ثباتاً واضحاً في درجة 40°م ولمدة 60 دقيقة

بعد الثبات الحراري من بين العوامل المهمة التي يمكن عن طريقها تحديد درجات الحرارة التي يحتفظ فيها الأنزيم بفعاليته ونشاطه وذلك التي تؤثر فيه سلباً ، ويتم على ضوءها اختيار درجات الحرارة الملائمة لاستعمال الأنزيم في التطبيقات العملية . وأجريت هذه الدراسة بحضن كل من محلول أنزيم السليوليز ومحلول أنزيم السليوليز بشكل مستقل

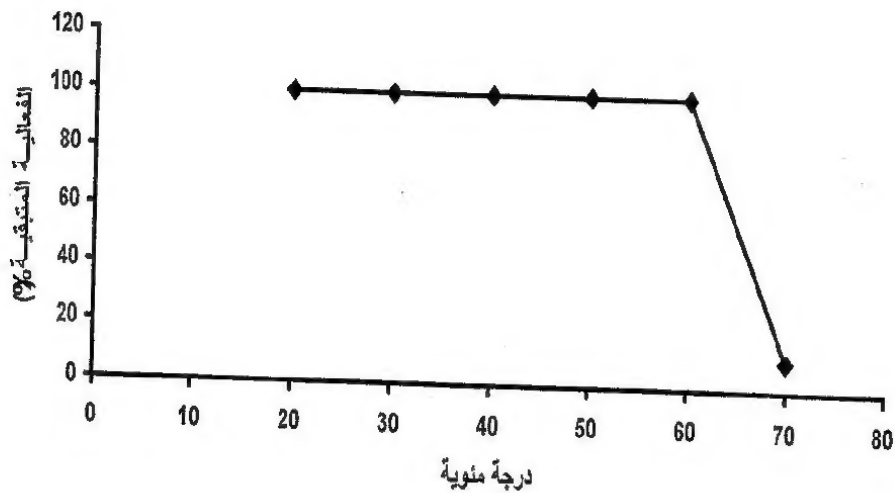
Hydrocellulase المنتج من العفن *A. aculeatus* يكون ثابتاً في درجات حرارة أقل من 50°م (26).
حصل Calsavara وآخرون (8) على نتائج مماثلة للنتائج الدراسة الحالية إذ كان أنزيم السلوبيز (Novozym 188) يبقى ثابتاً في درجة حرارة 60°م. تبقى فعالية السلوبيزات في شطر سكر β -glucan ثابتة ومستمرة لغاية درجة الحرارة 60°م (37).

ويحتفظ بحوالي 73% من فعاليته في درجة حرارة 50°م، في حين يبدي السلوبيز ثباتاً متميزاً في درجة حرارة 60°م لمدة 60 دقيقة ويقتد 90% من فعاليته في درجة حرارة 70°م

لقد وجد ان أنزيم β -glucosidase يحتفظ بحوالي 80% من فعاليته في درجة 50°م (19). ووجد ان أنزيم



شكل 9. منحنى الثبات الحراري لأنزيم السلوبيز (BCI) المنتج من العزلة *Aspergillus sp. A18*



شكل 10. منحنى الثبات الحراري لأنزيم السلوبيز (BCb2) المنتج من العزلة *Aspergillus sp. A18*

Clostridium thermocellum فقد كانت قيمة K_m له 0.61 ملي مول (37).

اما بخصوص قيمة V_{max} لأنزيم السيلوليز قيد الدراسة فيبين الجدول 2 الى ان هذا الأنزيم يمتلك أعلى سرعة عند استخدام السيلولوز كمادة تفاعل إذ بلغت 41.66 مايكرومول/ساعة مقارنة بـ 20 مايكرومول/ساعة عند استخدام CMC المعامل كمادة تفاعل و 10 مايكرومول/ساعة للقص المعامل.

أشار Tong (29) الى ان السيلوليزات المنتجة من ثلاثة أنواع لعفن *Aspergillus* تختلف في سرعتها القصوى (V_{max}) إذ بلغت السرعة للقصوى لأحدها 13.33 وحدة/ملغم بروتين ، ولآخر 8.33 وحدة/ملغم بروتين ، في حين كانت السرعة القصوى للثالث 11.11 وحدة/ملغم بروتين. اما Busto وآخرون (6) فقد ذكر ان أنزيم endo-Beta-glucanase المنتج من *T. reesei* يمتلك V_{max} تقدر بـ 40.3 مايكرومول/مل.

اما قيم K_m للسيلوليز باستخدام السيلولوز و CMC المعامل كمواد تفاعل هي 7.69 ملغم و 0.28 ملغم على الترتيب ، وقيم V_{max} 57.14 مايكرومول/ساعة و 16.66 مايكرومول/ساعة باستخدام السيلولوز و CMC المعامل. وهذا يعني ان مادة CMC الأكثر ملاءمة للسيلوليز قيد الدراسة ، وبما ان CMC المعامل هو Celooligosaccharide ويتكون من سلسلة طويلة لجزيئات الكلوكوز المرتبطة بأصرة (β) يمكن الاستدلال على ان السيلوليز المنتج من العزلة A_{18} هو نوع Hydrocellulases وتحديداً β -glucosidase.

وجد Bissett و Sternberg (5) في دراستهما ان قيمة K_m لأنزيم β -glucosidase المنتج من عفن *Aspergillus* بلغت 5 ملي مول ، و V_{max} 0.06 مايكرومول/حقيقة . اما Zhang و Lynd (37) فقد ذكر ان قيمة K_m لأنزيم cellobiase من *Clostridium thermocellum* قد بلغت 3.3 ملي مول ، بينما V_{max} له فكانت 0.5 ملي مول/مل .

جرى تعيين ثابت ميكاليس K_m والسرعة القصوى V_{max} لأنزيم السيلوليز (BCI) باستخدام مواد التفاعل المتمثلة بالسيلولوز و CMC المعامل والقص المعامل ، وبتابع طريقة Lineweaver-Burk (27) لرسم العلاقة بين مقلوب تركيز مادة التفاعل ومقلوب السرعة والتي أفرزت المنحنيات الخاصة بكل مادة تفاعل (الشكل 11 و 12 و 13) وتظهر النتائج ان قيم K_m لأنزيم السيلوليز (BCI) كانت 4 ، 0.8 و 0.33 ملغم لكل من السيلولوز و CMC المعامل والقص المعامل على الترتيب.

ان K_m هي أحد الثوابت المميزة لأنزيم ومادة التفاعل حيث تختلف باختلاف الأنزيم، مصدره وطبيعة مادة التفاعل المستعملة (27) . على ضوء قيم K_m المؤشرة أعلاه يكون القص المعامل هو مادة التفاعل الأكثر ملاءمة من بين المواد المستخدمة للسيلوليز المنتج من العزلة A_{18} قيد الاختبار ، وفي تجربة منفصلة استعمل فيها CMC غير المعامل لم تؤثر النتائج أي فعالية لهذا الأنزيم تجاه CMC غير المعامل وقد يحزى هذا الى وجود مجاميع الكربوكسيل التي تعد منبهاً للفعالية الأنزيمية لذلك تم اللجوء الى معاملة CMC لجعلها أقل ذائبيية (Insoluble celooligosaccharides) لتسهيل مهمة أنزيمات (Hydrocellulases) وقيامها بالفعل المطلوب (26).

ذكر Tsujisaka وآخرون (30) ان قيم K_m لأنزيم Basidiomycete spp. من exo- β -1,3-Glucanase باستخدام مواد التفاعل Laminaripentaose ، Laminarin و Laminaritetraose و Laminaritriose هي 0.16 و 2.01 و 2.24 و 1.34 ملي مول على الترتيب . اما Tong (29) فقد عزل مجموعة أعفان نوع *Aspergillus spp.* ووجد ان ثلاثة منها كانت منتجة للسيلوليز وعند استخدامه لورق الترشيح كمادة تفاعل لاحظ ان هذه الأنزيمات الثلاثة المنتجة تمتلك قيم K_m مختلفة ، إذ بلغت قيمة K_m لأنزيم الأول 40 ملغم/مل ، والثاني 25 ملغم/مل ، اما الثالث فقد كانت قيمة K_m له تساوي 28.6 ملغم/مل . وقد أشار Busto وآخرون (6) الى ان قيمة K_m لأنزيم endo-Beta-glucanase المنتج من *T. reesei* تساوي 1.31%. اما بخصوص السيلوليز المنتج من بكتريا

جدول 2. قيم V_{max} و K_m للسليوليز (BCI) والسلوباييز (BCb2) قيد الدراسة باستخدام مواد تفاعل مختلفة

السلوباييز BCb2		السليوليز BCI		مادة التفاعل
V_{max}	K_m	V_{max}	K_m	
مايكرومول/ساعة	ملغم	مايكرومول/ساعة	ملغم	
—	—	41.66	4	السليولوز
57.14	7.69	—	—	السلوبايوز
16.66	0.28	20	0.8	CMC المعامل
—	—	10	0.33	النقش المعامل

نقاوة الأنزيم :

أظهر ترحيل الأنزيم المنقى على هلام البولي اكريلاميد وجود حزمة واحدة لكل من السليوليز (BCI) والسلوباييز (BCb2) (شكل 11) ، وهذا دلالة على تنقية الأنزيم لغاية التجانس (Homogeneity) . يلاحظ عند استخدام 2-mercaptoethanol الى جانب SDS لتحطيم البروتين ظهور حزمتين متقاربتين من بعضهما لكلا الأنزيمين (شكل 12) وقد يدل هذا على ان الأنزيمين ربما يتكونان من سلسلتين من السلاسل البروتينية المرتبطة مع بعضها بواسطة الأواصر الثنائية الكبريتيد (S-S) .

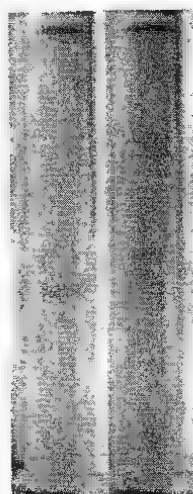
نقطة التعادل الكهربائي PI :

يلاحظ من الشكل 13 ظهور حزمة واحدة واضحة من البروتين لكل أنزيم وهذا دليل آخر على نقاوة الأنزيم . ويظهر الشكل 14 وجود فعالية أنزيمية للسليوليز (BCI) عند الأس الهيدروجيني 3.6 (القطعة 17) من الهلام ، وكذلك وجود فعالية أنزيمية للسلوباييز (BCb2) عند الأس الهيدروجيني 4.2 (القطعة 15) من الهلام عند قياس الفعالية الأنزيمية لكليهما .

ان وجود حزمة واحدة في القطعة المماثلة للهلام الآخر يشير الى ان حركة الأنزيم أصبحت صفراً في المجال

الكهربائي ، بمعنى آخر ان محصلة الشحنات التي تحملها تساوي صفراً عند الأس الهيدروجيني المذكور لكل أنزيم . بعبارة أخرى فإن هذا الأس الهيدروجيني هو قيمة PI للأنزيم . لقد وجد Murao و Sakamoto (21) ان نقطة التعادل الكهربائي لأنزيم Hydrocellulase المنتج من العفن *Aspergillus aculeatus* كانت تساوي 3.5 ، وفي تجربة أخرى بهذا الخصوص ذكر Murao و Sakamoto (22) ان تنقية أنزيم β -glucosidase المنتج من العفن *Aspergillus aculeatus* أظهرت ثلاث صور أنزيمية (1،2،3) من β -glucosidase وعند قياس PI كانت لكل منها 4.7 و 4.3 و 3.6 على الترتيب . في حين بين Tsujisaka وآخرون (30) ان نقطة التعادل الكهربائي لأنزيم β -1,3-glucosidase المنتج من *Basidiomycete spp.* تبلغ 9.2 .

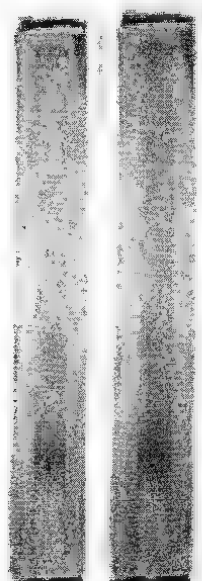
اما Uziie وآخرون (32) فقد أشار الى نقطة التعادل الكهربائي لأنزيم β -xylosidase المنتج من العفن *Chaetomium trilaterale* كانت 4.86 . في حين ذكر Mansfield وآخرون (18) ان أنزيمي endoglucanase (EGS و EGT) المنتجة من العفن *Gloeophyllum sepiarium* يمتلكان نقطة تعادل كهربائي هما 3.8 و 3.1 على الترتيب .



+

Cellobiase Cellulase

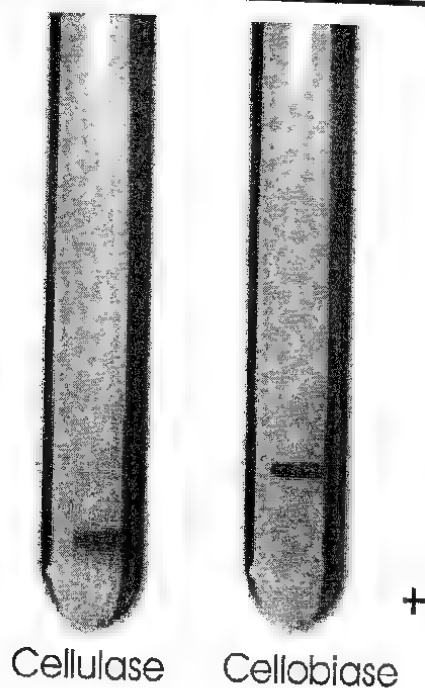
شكل 11. الترحيل الكهربائي لأنزيمي السليوليز BCl والسليوبايز BCb2



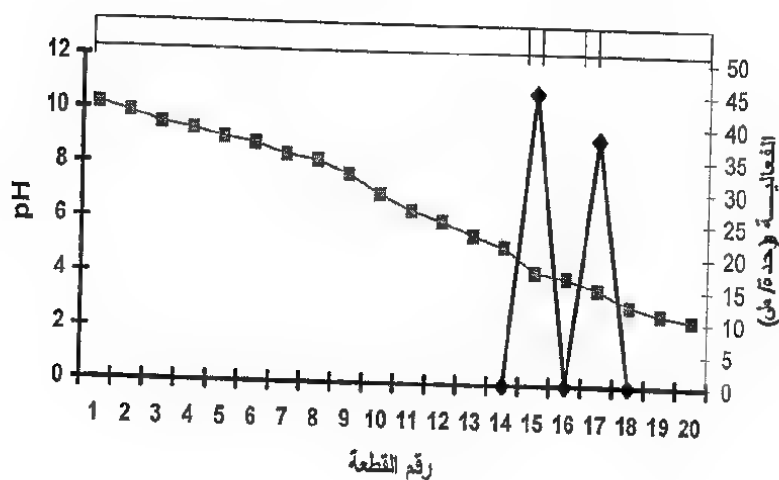
+

Cellobiase Cellulase

شكل 12. الترحيل الكهربائي لأنزيمي السليوليز BCl والسليوبايز BCb2 باستخدام 2-mercaptoethanol



شكل 13. حركة أنزيمي السليوليز BCl والسليوليز BCB2 في هلام تقدير نقطة التعادل الكهربائي بطريقة Isoelectric focusing



شكل 14. تقدير نقطة التعادل الكهربائي لأنزيمي السليوليز BCl والسليوليز BCB2 المنتجين من العزلة A18 لتقدير نقطة التعادل الكهربائي بطريقة Isoelectric focusing

تقدير الوزن الجزيئي :

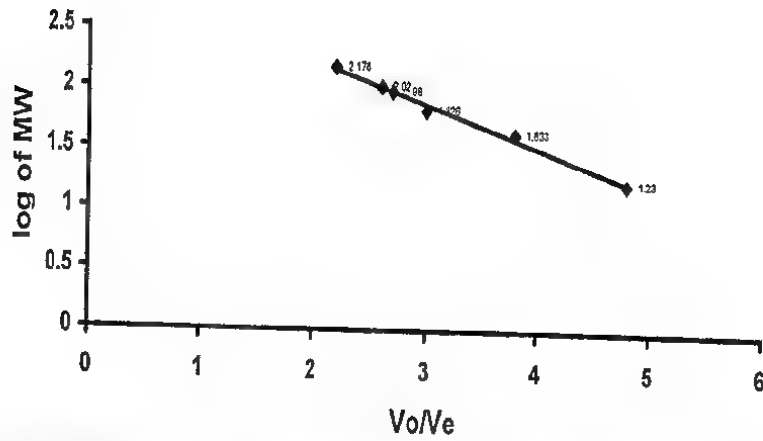
اتبعت طريقتان لتقدير الوزن الجزيئي للسليوليز BCI والسليوبايز BCb2 ، كانت الأولى باستخدام عمود الترشيح الهلامي نوع Sephadex G-200 ، كان يساوي 104 كيلودالتون للسليوليز BCI و 95 كيلودالتون للسليوبايز BCb2 (الشكل 15) . حصل Sakamoto و Murao (21) باستخدام طريقة الترشيح الهلامي ، على وزن جزيئي يساوي 68 كيلودالتون لأنزيم Hydrocellulase المنتج من العفن *Aspergillus aculeatus* ، أما Uziie وآخرون (32) فقد ذكروا أن الوزن الجزيئي لأنزيم β -xylosidase المنتج من *Chaetomium trilaterale* والمعين بطريقة الترشيح الهلامي (Sephadex G-200) كان يساوي ما يقارب 240 كيلودالتون. وقد قدر الوزن الجزيئي لأنزيم α -1,3-exo-Glucanase المنتج من Basidiomycete spp. المحدد بالترشيح الهلامي (Sephadex G-200) إذ بلغ 73 كيلودالتون (30) . أما Cai وآخرون (7) فقد ذكروا أن الوزن الجزيئي لأنزيمي (BGL-I) و (BGL-II) المنتجة من العرھون والذي حدد ببساطة بالترشيح الهلامي (Sephacryl S-200) بلغ 158 كيلودالتون و 256 كيلودالتون على الترتيب . أما Mansfield وآخرون (18) فقد ذكروا أن صورتي أنزيم endoglucanases (EGS و EGT) المنتجة من العفن *Geophyllum sepiarium* تتماثلان في وزنها الجزيئي المحدد باستعمال الترشيح الهلامي والذي بلغ 45.1 و 45.0 كيلودالتون ، على الترتيب .

وكانت الطريقة الثانية لتقدير الوزن الجزيئي للأنزيمين قيد الدراسة (BCI و BCb2) باستخدام تقنية الترحيل الكهربائي على هلام البولي اكريلاميد الحاوي على SDS (الشكل 16) . ومن العلاقة الخطية بين الحركة النسبية لهذه البروتينات ولوغارتم وزنها الجزيئي (الشكل 17)

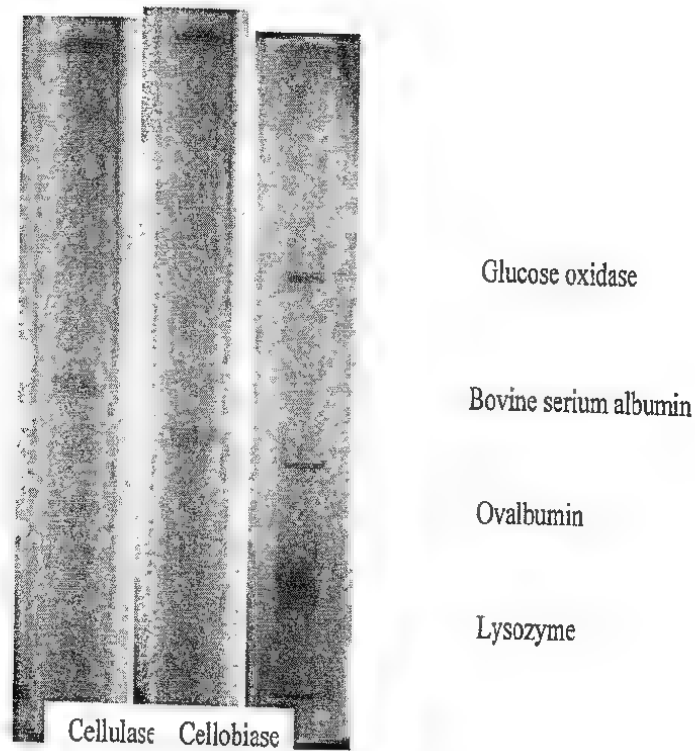
أمكن تقدير الوزن الجزيئي للسليوليز والسليوبايز من خلال تقدير الحركة النسبية لهما إذ بلغ 81.28 و 72.44 كيلودالتون ، على الترتيب .

مما تقدم يتضح أن استخدام تقنيات مختلفة لتقدير الوزن الجزيئي لبروتين معين ينتج عنها اختلاف في القمم المستحصلة وقد يكون مرد ذلك إلى الاختلافات في محتوى البروتين من الكربوهيدرات الذي ينعكس بدوره على انضغاط وزن جزيئي إلى البروتين يكون أكبر من الواقع وذلك باستخدام تقنية الترشيح الهلامي إذ يحاط البروتين بعدد كبير من جزيئات الماء مقارنة مع البروتينات الأخرى التي تخلو من أي جزء كربوهيدراتي من جانب آخر فإن الاختلاف الناتج في قيمة الوزن الجزيئي للبروتين ذاته عند تقديره بتقنية الترحيل الكهربائي وبوجود SDS ربما يعود إلى انخفاض نسبة ارتباط جزيئات SDS بالبروتين عند الترحيل لاحتوائه على جزء كربوهيدراتي مؤدياً بذلك إلى انخفاض نسبة الشحنة / الكتلة ثم تقليل حركته ليظهر البروتين بوزن جزيئي أكبر مما هو عليه في الحقيقة علماً أن حركة البروتينات في الهلام تتناسب عكسياً مع لوغارتم الوزن الجزيئي (1) وقد ينسب ذلك إلى سبب آخر.

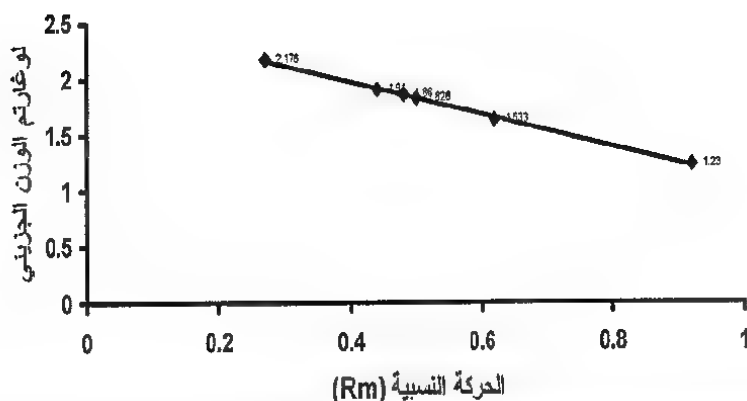
لقد وضع Kim وآخرون (14) أن مجموعة السليوليزات من العفن *Trichoderma viride* التي تحتوي على أربع صور أنزيمية endoglucanase I و II و III و IV وأنزيم واحد نوع exoglucanase قدر الوزن الجزيئي لها باستعمال الترحيل الكهربائي فكان 52 و 60 و 42 و 38 و 62 كيلودالتون ، على الترتيب . لقد قدر الوزن الجزيئي لأنزيم β -xylosidase من العفن *Termitomyces clypeatus* بالترحيل الكهربائي إذ بلغ 190 كيلودالتون (4) .



شكل 15. منحني تقدير الوزن الجزيئي لأنزيمي السليوليز BCl والسلوباينز BCl2 من العزلة *Aspergillus sp. A18* بطريقة الترشيح الهلامي (Sephadex G-200)



شكل 16. تقدير الوزن الجزيئي بالترجيل الكهربائي بطريقة Disc gel electrophoresis



شكل 17. منحنى تقدير الوزن الجزيئي لأنزيمي السليوليز BCl والسليولاييز BCb2 من العزلة *Aspergillus sp. A18* بطريقة الترحيل الكهربائي

SDS-Disc gel electrophoresis

T. reesei endoglucanase (EG III) وهو أيضاً ينتج من العفن

يبدأ بالعمل على تحليل السليولوز ولم تعرف آلية هذا النوع من الأنزيمات بعد (13). أكد Lynd وآخرون (17) أهمية الجزء الكربوهيدراتي الموجود في جزيئة الأنزيم والتي تدعى Carbohydrate Binding Modules (CBMs) إذ يرتبط هذا الجزء بسطح السليولوز ويساعد على تحليله عاملاً على توجيه المجموعة المحللة لتكون قريبة إلى مادة التفاعل الممثلة بالسليولوز غير الذائب، وإن وجود (CBMs) يكون ذا أهمية خصوصاً لأنزيمات exoglucanase لبدء عملها.

تشخيص السكريات الناتجة بفعل السليوليزات قيد الدراسة :

جرى تشخيص الكربوهيدرات الناتجة من فعل السليوليز (BCI) والسليولاييز (BCb2) المنتجين من العزلة *A18* بطريقتين كانت الأولى كروماتوغرافيا الورقة Paper Chromatography (PC) والثانية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة Thin Layer Chromatography (TLC). يلاحظ من الشكل (18-أ) والذي يمثل نتائج فصل نواتج تفاعل أنزيم السليوليز الخام والنقي على مادة السليولوز بطريقة (PC)، والتي تظهر أن السليوليز الخام يعمل على تكوين الكلوكون والسليولايوز وذلك من خلال تماثل قيم R_f النواتج مع R_f السكريات القياسية (الكلوكون والسليولايوز). أما الأنزيم النقي فيحرر السليولايوز بكمية أكثر من الكلوكون،

تقدير المحتوى الكربوهيدراتي للسليوليزات :

جرى تقدير نسبة الكربوهيدرات الكلية في السليوليز (BCI) والسليولاييز (BCb2) بطريقة الفينول-حامض الكبريتيك والموصوفة من قبل Dubois وآخرون (9)، وأظهرت النتائج أن أنزيم السليوليز النقي المنتج من العزلة *A18* كان خالياً من الكربوهيدرات بينما يحتوي أنزيم السليولاييز (BCb2) على 13.7% من الكربوهيدرات. إن احتواء أنزيم السليولاييز على هذه النسبة من الكربوهيدرات يفسر الفرق في الوزن الجزيئي بين الأنزيمين قيد الاختبار وكذلك مقاومة أنزيم السليولاييز للحرارة إذ أظهر ثباتاً حرارياً للغاية 70°م.

لقد ذكر Okada (23) أن صورتين أنزيم السليوليز (II-B و II-A) المنتجة من العفن *T. viride* يحتويان على 12-14% كربوهيدرات ككلوكوز. ووجد أن أنزيم β -xylosidase المنتج من العفن *Chaetomium trilaterale* يحتوي 20.7% كربوهيدرات بشكل كلوكون (32).

أوضح Våljamäe (33) أن أنزيم Cellobiohydrolase (CBH I) أحد أنزيمات *T. reesei* هو عبارة عن glycoprotein يحتوي على 6% من الكربوهيدرات، وإن الجزء الكربوهيدراتي موجود في الطرف الكربوكسيلي للسلسلة البروتينية. أما بالنسبة لأنزيم

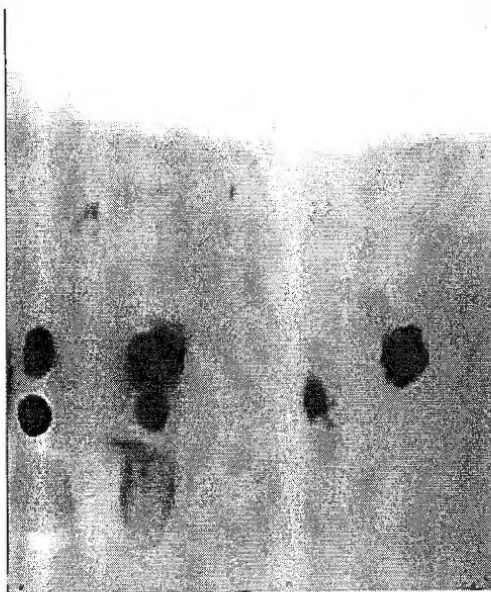
إذ يقوم هذا الأنزيم بتكوين السلوبيوز كخطوة أولى في تحليل السليلوز فضلاً على تكوين كمية من الكلوكوز وتؤدي الزيادة في تركيز السلوبيوز إلى تثبيط الأنزيم وقد يفسر هذا انخفاض الفعالية بعد 48 ساعة ، ويلاحظ من الشكل ذاته وجود سكريات أخرى قد تكون cellotriose و celltetrose والتي تتكون نتيجة عمل أنزيم السليلوليز (BCI) على مادة السليلوز.

تظهر نتائج البحوث الأخيرة المتعلقة بأنزيمات endoglucanases النقية والعائدة لأنظمة سليلوليزية عديدة ، ان قابلية هذه الأنزيمات في تحطيم السليلوز المتبلور ترتبط بقابليتها في تكوين الكلوكوز كناتج ذائب نتيجة لعملية التحلل (15) ، فكلما كان الفعل الأنزيمي عشوائياً وبدرجة كبيرة ، كلما انخفض فعل الأنزيم في تحليل السليلوز المتبلور ومن ثم خفض كمية الكلوكوز المنكون (Int:1) ، وهذا يطابق فعل أنزيم السليلوليز النقي (BCI) قيد الاختبار إذ يلاحظ تكون الكلوكوز بنسبة قليلة مقارنة بالسلوبيوز ، وهذا يدل على ان الأنزيم ذو فعل عشوائي وبدرجة كبيرة وهذا مؤشر آخر على كون أنزيم (BCI) المنتج من العزلة A₁₈ هو من نوع endoglucanase . وأظهرت طريقة الفصل الثانية (TLC) نتائج مماثلة (الشكل 19) إذ يلاحظ ان نسبة الكلوكوز الناتجة كانت قليلة جداً ومتداخلة مع السليلوز وذلك لتقارب قيمة R_f للكلوكوز مع قيمة R_f للسليلوز ، ويمكن التأكيد هنا على ان الأنزيم من نوع endoglucanase بسبب فعله العشوائي الذي ينتج عنه السلوبيوز وقليلاً من الكلوكوز . نذكر كل من

Philippidis وآخرون (25) و Mosier وآخرون (20) في دراساتهم على السليلوليز المنتج من بكتريا *Clostridium thermocellum* وعفن *Trichoderma spp.* ان تحليل السليلوز يثبط بوساطة السليلوبيوز الناتج وبدرجة أقل بوساطة الكلوكوز.

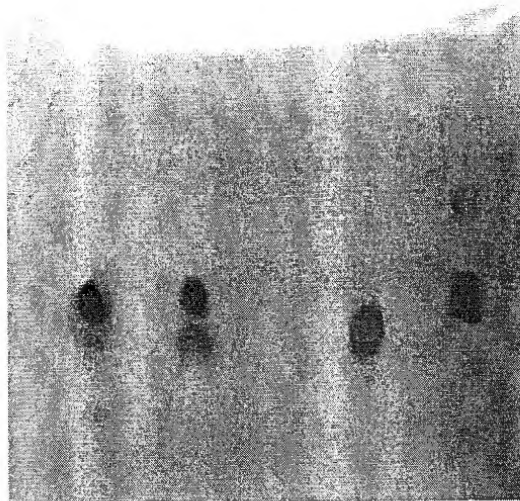
اما الشكل (18-ب) فيمثل نتائج فصل نواتج تحليل السلوبيوز بوساطة السلوبيلايز الخام والنقي بطريقة (PC) ، إذ يمكن ملاحظة تكون الكلوكوز بشكل واضح فضلاً عن بقاء جزء من السلوبيوز لعدم اكتمال التحليل ، ويمثل الشكل (24) نواتج تحليل السلوبيوز بطريقة (TLC) إذ يمكن ملاحظة تكون الكلوكوز من السلوبيوز.

استخدم Tsujisaka وآخرون (30) كروماتوغرافي الورق لفصل نواتج تحليل Laminarin ، Curdlan و Scleroglucan بوساطة أنزيم exo-β-1,3-Glucanase ، وأظهرت النتائج ان معظم المواد الناتجة هي كلوكوز وان نسبة تحليل Laminarin كانت تمثل أكثر من 90% وفي حالة استعمل Scleroglucan كانت النواتج تحتوي على الكلوكوز والجنتيوبايوز gentiobiose . اما Uchino و Nakane (31) فقد استخدموا كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) باستخدام طبقات رقيقة نوع (Avicel SF) لفصل نواتج تحليل الزايلان بوساطة أنزيم Xylanase المنتج من البكتريا *Bacillus spp.* فظهرت النواتج المفصولة على انها تمثل الزايلوبيوز X₂ والزايلوترايوز X₃ والزايلوتيتروز .



كلوكونز سلوبايوز سليلوز سليلوز خام سليلوز نقي

شكل 18-أ. فصل نواتج تفاعل السليلوز الخام والنقي على مادة السليلوز بطريقة (PC)

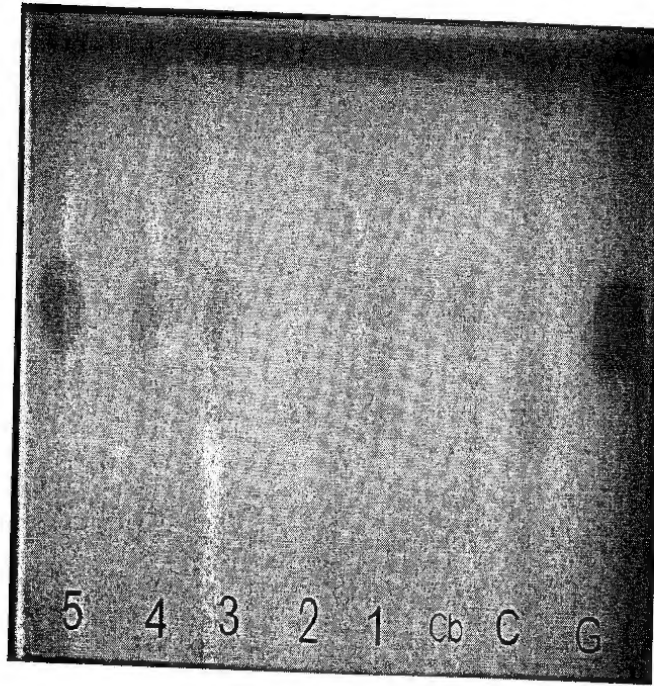


كلوكونز سلوبايوز سليلوز سليلوز خام سليلوز نقي

شكل 18-ب. فصل نواتج تفاعل السليلوز الخام والنقي على مادة السليلوز بطريقة (PC)

انتاج نوعين في الأقل من أنزيمات β -glucosidase من العفن *T. reesei* لكي يساعد ذلك على تحليل السلويوز والسكريات المتعددة الصغيرة الى كلوكوز ، حيث تم عزل أنزيمين هما BCl I و BCl II من رشح المزرعة الفطرية.

أشار Peiris و Silva (24) الى استخدام كروماتوگرافي الورق للسلوليزات المنتجة من العفن *T. reesei* ، إذ أظهرت النتائج ان نواتج تحليل قش الرز بهذه الأنزيمات تشتمل على الكلوكوز بشكل رئيسي ، والزايلوز والسلويوز. وأوضح Lynd وآخرون (17) أنه يتطلب



شكل 19. فصل نواتج تفاعل السلوليز والسلويابيز الخام والتنقي بطريقة (TLC)

G = كلوكوز قياسي ، C = سلولوز قياسي ، Cb = سلويابوز قياسي ، 1 = نواتج تفاعل المستخلص الخام على السلولوز ، 2 = نواتج تفاعل السلوليز التنقي (BCI) على السلولوز ، 3 = نواتج تفاعل المستخلص الخام على السلويابوز ، 4 = نواتج تفاعل السلويابيز التنقي (BCb2) على السلويابوز ، 5 = السكر المتبلور المنتج من القش المعامل

- 3- Akinyosoye, F.A., D.J. Arotupin and J.A. Akinyanju.1995. Cellulolytic activity at a fresh isolate of *Aspergillus niger* from Sawdust. Bioscience Research Communications, 7 (1):25-29.
- 4- Bhattacharyya, S., S. Khowala, A. Kumar and S. Sengupta.1997. Purification and characterization of an extracellular bet-

المصادر

- 1- عمران ، محفوظة عباس . 1997 . تنقية وتوصيف أنزيم بيروكسيداز سعف النخيل . رسالة ماجستير - كلية العلوم - جامعة بغداد .
- 2- Abdel-Naby, M.A.1999. Stabilization of cellobiase by covalent coupling to soluble polysaccharide. Microbiol. Res.,154 (2):213-218.

- 15- Klyosov, A.A.1990.Trends in biochemistry and enzymology of cellulose degradation. *Biochemistry*, 29:10577-10585.
- 16- Li X.L., H.Z. Chen and L.G. Ljungdahl.1997.Two cellulases, Cel A and Cel C, from the polycentric anaerobic fungus *Orpiomyces* Strain PC-2 contain N-terminal docking domains for a cellulase-hemicellulase complex. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63 (12):4721-4728.
- 17- Lynd,L.R., P.J. Weimer, W.H. Vanzyl and I.S. Preforius.2002. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66 (3):506-577.
- 18- Mansfield, S.D., J.N. Saddler, and G.M. Gubitz.1998. Characterization of endoglucanases from the brown rot fungi *Gloeophyllum sepiarium* and *Gloeophyllum trabeum*. *Enzyme of Microbial Technology*, 23 (1-2): 133-140.
- 19- Miyairi, S., M. Sugiura and S. Fukui.1978.Immobilization of β - glucosidase in fibroin membrane. *Agric. Biol. Chem.*, 42 (9): 1661-1667.
- 20- Mosier,N.S., P. Hall, C.M. Ladisch and M.R. Ladisch.1999. Reaction kinetics, molecular action, and mechanisms of cellulolytic proteins. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 65: 23-40.
- 21- Murao,S. and R. Sakamoto.1979 a. Hydrocellulase of *Aspergillus aculeatus*. *Agric. Biol. Chem.*, 43 (8):1789-1790.
- 22- Murao,S. and R. Sakamoto.1979 b. β -glucosidase of *Aspergillus aculeatus*. *Agric. Biol. Chem.*, 43 (8):1791-1792.
- 23- Okada, G. 1975. Enzymatic studies on a cellulase system of *Trichoderma viride*. II. Purification and properties of Two cellulases. *J. Biochem.*, 77:33-42.
- 24- Peiris, P. S. and I. Silva.1987.Hydrolysis of rice straw to fermentable sugars by *Trichoderma* enzymes. *Mircen Journal*, 3:57-65.
- 25- Philippidis,G.P., T.K. Smith and C.E Wyman.1993.Study of the enzymatic hydrolysis of cellulose for production of fuel ethanol by the simultaneous saccharification and fermentation process. *Biotechnol. Bioeng.*, 41:846-853.
- 26- Sakamoto, R., M. Arai and S. Murao.1984. Enzymatic properties of xylosidase of *Termitomyces clypeatus*. *Biotechnology Progress*, 13 (6): 822-827.
- 5- Bissett, F. and D. Sternberg.1978. Immobilization of *Aspergillus* Beta Glucosidase on Chitosan. *Applied and Environmental Microbiology*, Apr., 35 (4): 750-755.
- 6-Busto, M.D., N. Ortega and M. Perez-Mateos.1998. Characterization of microbial endo-beta-glucanase immobilized in alginate beads. *Acta Biotechnologica*, 18 (3): 189-200.
- 7- Cai, Y.J., J.A. Buswell and S.T. Chang.1998. Beta-glucosidase components of the cellulolytic system of the edible straw mushroom, *Volvaiaella volvacea*. *Enzyme of Microbial Technology*, 22(2): 122-129. (Abstract).
- 8- Calsavara, L.P., F.F. De Moraes and G.M. Zanin.2001.Comparison of catalytic properties of free and immobilized cellobiase novozym 188. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 91-93: 615-626.
- 9- Dubois, M., J. Hamilton and F. Smith.1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Biochem.*, 28: 350-356.
- 10- Garfin,D.E.1990.Purification Procedures: electrophoretic methods. In: M.P. Deutscher (ed)., *Methods in Enzymology* Academic Press, New York. Vol. 182: 425-441.
- 11- Godfrey, T. 1983. *Industrial Enzymology*. Tony, Godfrey and Jon Reichelt. M., The Nature Press, UK.
- 12- Gouda, M.K. and M.A. Abdel-Naby.2002.Catalytic properties of the immobilized *Aspergillus tamaraii* xylanase. *Microbiol. Res.* 157 (4): 275-281.
- 13-Henriksson, G., A. Nutt, H. Henriksson, B. Pettersson, J.Stahlberg, G. Johansson and G. Pettersson.1999. Endoglucanase 28 (Cell 2A), a new *Phanerochaete chrysosporium* cellulose. *Eur. J. Biochem.*, 259:88-95.
- 14- Kim, D.W., Y.K. Jeong, Y.H. Jang and J.K. Lee.1994.Purification and characterization of endoglucanase and exoglucanase components from *Trichoderma viride*. *Fermentation and Bioengineering*, 77(4): 363-369.

- 32- Uziie, M., M. Matsuo and T. Yasui.1985. Purification and some properties of *Chaetomium trilateale* β -xylosidase. Agric. Biol. Chem., 49(4): 1159-1166.
- 33- Väljamäe, P. 2002. The kinetics of cellulose enzymatic hydrolysis. Implications of the synergism between enzymes. Acta Universitatis Upsaliensis, Uppsala. Sweden.
- 34- Whitaker, J.R. 1972. Principles of Enzymology for the Food Sciences. Dekker - New York.
- 35- Witkowska, D. 1990. Isolation and characteristics of cellulases from culture filtrate of *Trichoderma viride* C-1. Zeszyty-Naukowe Akademii Rolniczej We Wrocławiu Technologia-Zywnosci (Poland). (No. 184) p. 255-266. (Abstract).
- 36- Wrigley, C.W. 1971. Electro-Focusing. In: W.B., Jokby (ed.), Methods in Enzymology. Academic Press, New York. Vol. 22
- 37- Zhang, Y.P. and R. Lynd. 2004. Kinetics and relative importance of phosphorolytic and hydrolytic cleavage of cellodextrins and cellobiose in cell extracts of *Clostridium thermocellum*. Appl. Environ. Microbio., 70 (3): 1563-1569.
- hydrocellulase from *Aspergillus aculeatus*. J. Ferment. Technol., 62 (6) : 561-567.
- 27- Segel, I.H. 1976. Biochemical Calculations. 2nd. Edn. John Wiley & Sons. Inc.
- 28- Tavares, V.B., E. Gomes and R. Dasilva. 1997. Characterization of cellulase-free xylanase producing *Bacillus sp.* for biobleaching of kraft pulp. Revista de Microbiologia, 28 (3): 179-182. (Abstract).
- 29- Tong, C.C. 1984. Properties of cellulases produced by the isolated *Aspergillus* species in the biological conversion of cellulose to reducing sugars. Proceedings of the Regional Seminar-Workshop on Biotechnology in Industrial Development. Serdang, Selangor (Malaysia) p. 71-83.
- 30- Tsujisaka, Y., N. Hamada and R. Kobayashi. 1981. Purification and some properties of an exo- β -1,3-glucanase from Basidiomycete species. Agric. Biol. Chem., 45(5): 1201-1208.
- 31- Uchino, F. and T. Nakane. 1981. A thermostable xylanase from a thermophilic acidophilic *Bacillus sp.* Agric. Biol. Chem., 45(5): 1121-1127.